



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10324639 A**(43) Date of publication of application: **08.12.98**

(51) Int. Cl

A61K 39/395
A61K 39/395
A61K 38/00
A61K 45/00
C12N 15/02
// C07K 16/24
C07K 16/28
C12P 21/08

(21) Application number: **10072449**(22) Date of filing: **20.03.98**(30) Priority: **21.03.97 JP 09 68467**(71) Applicant: **CHUGAI PHARMACEUT CO LTD**(72) Inventor: **MIHARA MASAHIKO**

**(54) PREVENTING AND THERAPEUTIC AGENT FOR
 DISEASE ASSOCIATED WITH SENSITIZED T
 CELL CONTAINING IL-6 ANTAGONIST AS
 ACTIVE INGREDIENT**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject preventing or therapeutic agent useful for diseases associated with a sensitized T cell by including an interleukin-6(IL-6) antagonist as an active agent therein.

SOLUTION: This preventing and therapeutic agent or a sensitized T cell suppressant is obtained by including an IL-6 antagonist as an active ingredient and is useful for diseases associated with a sensitized T cell (e.g.

multiple sclerosis, uveitis, chronic thyroiditis, delayed anaphylaxis, contact dermatitis or atopic dermatitis). The IL-6 antagonist is a substance capable of blocking the information transmission with the IL-6 and inhibiting biological activities of the IL-6. For example, an anti-IL-6 antibody (e.g. a monoclonal antibody or a polyclonal antibody), an anti-IL-6 receptor antibody (e.g. an MR16-1 antibody or a PM-1 antibody), an anti-gp130 antibody, a modified antibody (e.g. an recombinant tape antibody, a chimeric antibody or a humanized antibody) and a partial peptide of the IL-6 or an IL-6 receptor are cited as the IL-6 antagonist.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-324639

(43) 公開日 平成10年(1998)12月8日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 39/395

識別記号

A B A

F I

A 6 1 K 39/395

A B A D

U

38/00

45/00

45/00

C 0 7 K 16/24

C 1 2 N 15/02

16/28

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-72449

(22) 出願日 平成10年(1998)3月20日

(31) 優先権主張番号 特願平9-68467

(32) 優先日 平9(1997)3月21日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

(72) 発明者 三原 昌彦

静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

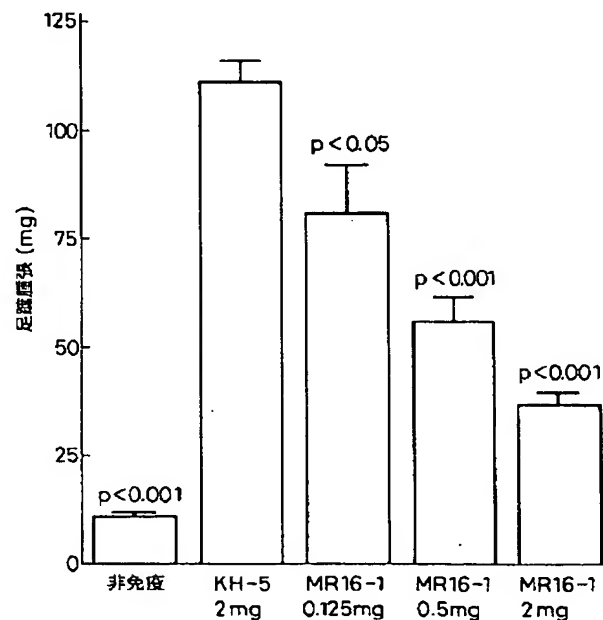
(54) 【発明の名称】 I L - 6 アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防・治療剤

(57) 【要約】

【課題】 感作T細胞関与疾患の新規な予防・治療剤の提供。

【解決手段】 インターロイキン-6 (I L - 6) アンタゴニスト、例えば I L - 6 受容体に対する抗体、I L - 6 に対する抗体、g p 1 3 0 に対する抗体等を含んで成る、感作T細胞関与疾患の予防または治療剤。

図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する感作T 細胞関与疾患の予防または治療剤。

【請求項 2】 IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体であることを特徴とする請求項1 記載の予防または治療剤。

【請求項 3】 IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項2 に記載の予防または治療剤。

【請求項 4】 IL-6アンタゴニストがヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3 に記載の予防または治療剤。

【請求項 5】 IL-6アンタゴニストがマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3 に記載の予防または治療剤。

【請求項 6】 IL-6アンタゴニストがPM-1抗体であることを特徴とする請求項4 に記載の予防または治療剤。

【請求項 7】 IL-6アンタゴニストがMR16-1抗体であることを特徴とする請求項5 に記載の予防または治療剤。

【請求項 8】 IL-6アンタゴニストがヒト抗体定常領域を有するIL-6受容体に対する抗体であることを特徴とする請求項4 に記載の予防または治療剤。

【請求項 9】 IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対するキメラ抗体またはヒト型化抗体であることを特徴とする請求項4 に記載の予防または治療剤。

【請求項 1 0】 IL-6アンタゴニストがヒト型化PM-1抗体であることを特徴とする請求項9 に記載の予防または治療剤。

【請求項 1 1】 感作T 細胞関与疾患が、多発性硬化症、ぶどう膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎またはアトピー性皮膚炎である、請求項1 ないし10に記載の予防または治療剤。

【請求項 1 2】 IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する感作T 細胞抑制剤。

【請求項 1 3】 IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する感作T細胞抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】本発明はインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する感作T 細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。また、本発明は、IL-6アンタゴニストを有効成分とする感作T 細胞抑制剤に関する。さらに、本発明はIL-6受容体に対する抗体を有効成分とする感作T 細胞抑制剤に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】IL-6はB 細胞刺激因子2 (BSF2) あるいはインターフェロン β 2 とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、B リンパ球系細胞の活性化に関する分化因子として発見され (Hirano, T. et al., Nature (1

986) 324, 73-76)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった (Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78)。IL-6は、T リンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている (Lotz et al., J. Exp. Immunol. 18: 1253-1258, 1988)。

【0 0 0 3】IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体である。IL-6受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6受容体としても存在する。もう一つは、非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約130kD の膜蛋白質gp130 である。IL-6とIL-6受容体はIL-6/IL-6受容体複合体を形成し、次いでgp130 と結合することにより、IL-6の生物学的活性が細胞内に伝達される (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967)。

【0 0 0 4】IL-6アンタゴニストは、IL-6の生物学的活性の伝達を阻害する物質であり、これまでに、IL-6に対する抗体 (抗IL-6抗体)、IL-6受容体に対する抗体 (抗IL-6受容体抗体)、gp130 に対する抗体 (抗gp130 抗体) が知られている。また、その他に、国際特許出願公開番号WO 95-00852、国際特許出願公開番号WO 95-11303、国際特許出願公開番号WO 96-34104、国際特許出願公開番号WO 96-18648、国際特許出願公開番号WO 96-17869、特開平7-324097、特開平8-311098に開示されたIL-6アンタゴニストが知られている。

【0 0 0 5】抗IL-6受容体抗体に関しては、いくつかの報告がある (Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146、Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630、国際特許出願公開番号WO 95-09873、フランス特許出願公開番号FR 2694767、米国特許番号US 521628)。その一つであるマウス抗体PM-1 (Hirata, et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906) の相補性決定領域 (CDR) をヒト抗体へ移植することにより得られたヒト型化PM-1抗体が知られている (国際特許出願公開番号WO 92-19759)。

【0 0 0 6】一方、多くの自己免疫疾患やアレルギー疾患において、特定の抗原を認識するT細胞 (感作T細胞) が存在し、この感作T細胞が病態に関与していることが知られている。例えば、多発性硬化症ではミエリン塩基性タンパク (Zhang, J. et al., J. Exp. Med (1994) 179, 973-984)、ぶどう膜炎ではS抗原 (Nussenblatt, R.B. et al., Am. J. Ophthalmol (1980) 89, 173-179)、慢性甲状腺炎ではサイログロブリン、アトピー性皮膚炎では食物、ダニなど (Kubota, Y. et al., J. Dermatol (1993) 20, 85-87, Kondo, N. et al., J. Allergy Clin. Immunol (1993) 91, 658-668)、遅延型過敏症では細菌、ウイルス、カビなど、接触性皮膚炎では金属、漆などを抗原とする感作T細胞の存在が知られている。

【0007】さらに、これらの抗原を動物に免疫したり、抗原特異的感作T細胞を非免疫動物に移入することによりヒトと類似の病態を誘導することも可能である。このことから、感作T細胞が上記疾患において重要な役割を果たしていると考えられている。現在、これら疾患の治療にはステロイド剤や免疫抑制剤が使用されているが、対症療法であり、しかも長期間の投与が必要とされ、副作用が問題となっている。これまでに、上記のようなIL-6アンタゴニストが感作T細胞抑制効果を示し、感作T細胞が関与する疾患に対して治療効果を有することは知られていなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、前記の欠点を有さない感作T細胞関与疾患の治療剤を提供しようとするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。本発明はまた、IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。本発明はまた、IL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。本発明はまた、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

【0010】本発明はまた、PM-1抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。本発明はまた、MR16-1抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。本発明はまた、ヒト抗体定常領域(C領域)を有するIL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。本発明はまた、IL-6受容体に対するキメラ抗体またはヒト型化抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。本発明はまた、ヒト型化PM-1抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。本発明はまた、上記IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する多発性硬化症、ぶどう膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎またはアトピー性皮膚炎の予防または治療剤に関する。本発明はまた、IL-6アンタゴニストを有効成分とする感作T細胞抑制剤に関する。本発明はさらに、IL-6受容体に対する抗体を有効成分とする感作T細胞抑制剤に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

1. IL-6 アンタゴニスト

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストは、感作T細胞の抑制効果または、感作T細胞が関与する疾患の予防または治療効果を示すものであれば、その由来、種類および形状を問わない。IL-6アンタゴニストは、IL-6による情報伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する物質である。IL-6アンタゴニストとしては、抗IL-6抗体、抗IL-6受容体抗体、抗gp130抗体、IL-6改変体、あるいはIL-6またはIL-6受容体の部分ペプチドが挙げられる。

【0012】1-1. 抗IL-6抗体

10 本発明で使用される抗IL-6抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する抗体である。このような抗体としては、MH166 (Matsuda et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) やSK2抗体 (Sato, K. et al., 第21回 日本免疫学会総会、学術記録(1991) 21, 166) 等が挙げられる。

【0013】1-1-1. IL-6 の調製

30 抗IL-6抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0014】具体的には、抗IL-6抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6は、Eur. J. Biochem (1987) 168, 543、J. Immunol. (1988) 140, 1534、あるいはA. Argic, Biol. (1990) 54, 2685に開示されたIL-6遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。IL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-6蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

【0015】1-2. 抗IL-6受容体抗体

50 本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的

手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6受容体と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する抗体である。

【0016】このような抗体としては、MR16-1抗体 (Saito, et al., J. Immunol. (1993)147, 168-173)、PM-1抗体 (Hirata, et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906)、AUK12-20抗体、AUK64-7抗体あるいはAUK146-15抗体 (国際特許出願公開番号W0 92-19759) などが挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてPM-1抗体が挙げられる。なお、PM-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、PM-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成2年7月10日に、FERM BP-2998としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。また、MR16-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株はRat-mouse hybridoma MR16-1として、平成9年3月13日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5875として寄託された。

【0017】1-2-1. IL-6受容体の調製

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6受容体を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0018】具体的には、抗IL-6受容体抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6受容体は、欧州特許出願公開番号EP 325474に、マウスIL-6受容体は日本特許出願公開番号特開平3-155795に開示されたIL-6受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。IL-6受容体蛋白質は、細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱しているもの (可溶性IL-6受容体) (Yasukawa, et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676) との二種類がある。可溶性IL-6受容体抗体は細胞膜に結合しているIL-6受容体の実質的に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6受容体と異なっている。

【0019】IL-6受容体の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体を発現している細胞やIL-6受容体蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。ヒトIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpIBIBSF2Rを含有する大腸菌 (E.coli) は、平成元年 (1989年) 1月

9日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、HB101-pIBIBSF2Rとして、受託番号FERM BP-2232としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0020】1-3. 抗gp130抗体

本発明で使用される抗gp130抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗gp130抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はgp130と結合することにより、IL-6／IL-6受容体複合体のgp130への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する抗体である。このような抗体としては、AM64抗体 (特開平3-219894)、4B11抗体および2H4抗体 (US5571513) B-S12抗体およびB-P8抗体 (特開平8-291199) などが挙げられる。

【0021】1-3-1. gp130の調製

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、gp130を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0022】具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるgp130は、欧州特許出願公開番号EP 411946に開示されたIL-6受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。gp130の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のgp130蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、gp130を発現している細胞やgp130蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

【0023】1-4. 抗体産生ハイブリドーマの作製

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。

また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

【0024】このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8: 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133) 等が適宜使用される。

【0025】前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0026】免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1~10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000~6000程度のPEG溶液を通常、30~60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

【0027】当該ハイブリドーマは、通常の前記培養液、例えば、HAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するの

に十分な時間、通常数日~数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングが行われる。

【0028】また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原蛋白質または抗原発現細胞で感作し、感作Bリンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、所望の抗原または抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原または抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい (国際特許出願公開番号WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735 参照)。

【0029】このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0030】例えば、抗IL-6受容体抗体産生ハイブリドーマの作製は、特開平3-139293に開示された方法により行うことができる。工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成2年7月10日に、FERM BP-2998としてブタベスト条約に基づき国際寄託されたPM-1抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウス (日本クレア製) の腹腔内に注入して腹水を得、この腹水からPM-1抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5%BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim 製) 含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM培地 (GIBCO-BRL 製)、PFHM-I培地 (GIBCO-BRL 製) 等で培養し、その培養上清からPM-1抗体を精製する方法で行うことができる。

【0031】1-5. 組換え型抗体

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる

(例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照)。

【0032】具体的には、目的とする抗体を産生するハ

イブリドーマから、抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. ら、*Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chmczynski, P. ら、(1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia 製)等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製)を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

【0033】得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDERACE Kit (Clontech製)およびPCRを用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. ら、*Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932)を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

【0034】目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【0035】1-6. 改変抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト型化(Humanized)抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576 参照)。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

【0036】例えば、キメラPM-1抗体のL鎖およびH鎖のV領域をコードするDNAを含むプラスミドは、各々pPM-k3およびpPM-h1と命名され、このプラスミドを有する大腸菌は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limitedに、1991年2月11日に、各々NC

IMB 40366、NCIMB40362としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている(国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照)。ヒト型化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている(欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576 参照)。

【0037】具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(FR; framework region)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)。

【0038】キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用される。ヒト抗体C領域としては、C γ が挙げられ、例えば、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域(framework region; FR)およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化PM-1抗体が挙げられる(国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照)。

【0039】1-7. 発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター/エンハンサー(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)を挙げることができる。

【0040】また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レ

トロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0041】大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、WO96/30394を参照)。

【0042】複製起源としては、SV 40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0043】真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 が知られている。植物細胞としては、Nicotiana tabacum 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばア

スペルギウス属 (Aspergillus) 属、例えばアスペルギウス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

【0044】原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、in vivoにて抗体を産生してもよい。

【0045】一方、in vivoの産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

【0046】これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。 (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0047】また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをAgrobacterium tumefaciensのようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばNicotiana tabacumに感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0048】上述のようにin vitroまたはin vivoの産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H鎖) または軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいは

はH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい（国際特許出願公開番号WO 94-11523 参照）。

【0049】1-8. 抗体修飾物

本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、FvまたはH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照）。

【0050】scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリンカーを介して連結される（Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

【0051】scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結するように規定するプライマー対を組み合わせることで増幅することにより得られる。また、一旦scFvをコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

【0052】これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本願特許請求の範囲でい

う「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0053】1-9. 抗体の分離・精製

1-9-1. 抗体の分離・精製

前記のように発現・産生された抗体は、宿主細胞内外から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、POROS、Sephrose F.F.等が挙げられる。

【0054】その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLCに適用可能である。または逆相HPLCを使用することもできる。

【0055】1-9-2. 抗体の濃度測定

上記2-1で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、をPBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 ODとして算出する。また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M 重炭酸緩衝液 (pH9.6) で1 μg/ml に希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAGO製) 100 μl を96穴プレート (Nunc製) に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固着化する。

【0056】ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製) 100 μl を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100 μl を加え、室温にて1時間インキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nmでの吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

【0057】1-10. 抗体以外のIL-6アンタゴニスト

本発明で使用されるIL-6改変体は、IL-6受容体との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6改変体はIL-6受容体に対しIL-6と競合的に結合するが、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。IL-6改変体

は、IL-6のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。IL-6改変体のもととなるIL-6はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒトIL-6である。具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。

【0058】適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じてIL-6改変体を得ることができる。IL-6改変体の具体例としては、Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、及びSavino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, W096-18648, W096-17869 に開示されている。

【0059】本発明で使用されるIL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、各々IL-6受容体あるいはIL-6との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドはIL-6受容体又はIL-6に結合し、これらを捕捉することによりIL-6のIL-6受容体への結合を特異的に阻害する。その結果、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列においてIL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。このようなペプチドは、通常10~80、好ましくは20~50、より好ましくは20~40個のアミノ酸残基からなる。

【0060】IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列において、IL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域を特定し、その一部又は全部のアミノ酸配列を通常知られる方法、例えば遺伝子工学的的手法又はペプチド合成法により作製することができる。IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドを遺伝子工学的的手法により作製するには、所望のペプチドをコードするDNA 配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じて得ることができる。

【0061】IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。具体的には、続医薬品の開発第14巻ペプチド合成 監修矢島治明廣川書

店1991年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドのC末端に対応するアミノ酸を結合させ、 α -アミノ基及び側鎖官能基を適切な保護基で保護したアミノ酸をC末端からN末端方向の順番に1アミノ酸ずつ縮合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドの α -アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用いられる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類によりBoc 法とFmoc法に大別される。

【0062】このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体から切断する。ペプチド鎖との切断反応には、Boc 法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン酸を、又はFmoc法ではTFA を通常用いることができる。Boc 法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体から切断しペプチドを回収する。これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られる。一方、Fmoc法では、例えばTFA 中で上記と同様の操作で脱保護反応及びペプチド鎖の支持体から切断反応を行うことができる。

【0063】得られた粗ペプチドは、HPLCに適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水-アセトニトリル系溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして精製したペプチド画分について、マスマスペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。IL-6部分ペプチド及びIL-6受容体部分ペプチドの具体例は、特開平 2 - 188600、特開平 7 - 324097、特開平 8 - 311098及び米国特許公報US 5210075 に開示されている。

【0064】2. IL-6アンタゴニストの活性の確認

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストの活性の評価は、通常知られた方法を使用することができる。例えば、IL-6依存性細胞MH60、BSF2 にIL-6を添加し、IL-6アンタゴニストを共存させることによりIL-6依存性細胞の³H-チミジン取込みを指標として評価すればよい。また、IL-6受容体発現細胞であるU266に対し¹²⁵I標識IL-6と過剰量の非標識IL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを加え、IL-6受容体発現細胞に結合した¹²⁵I標識IL-6を測定することにより、評価すればよい。

【0065】3. 治療効果の確認

本発明により達成される効果を確認するには、本発明で使用されるIL-6アンタゴニストを、抗原投与などでT 細胞が感作された状態の動物や感作T 細胞を移入した動物に投与し、感作T 細胞の抑制効果を評価することにより行うことができる。動物に投与される感作抗原としては、例えば、結核菌を用いることができる。また、免疫

される動物としては、通常実験に用いられる動物でよく、例えば、マウス、ラット、ウサギなどを用いることができる。評価する本発明の効果の確認は、抗原免疫した動物に同一の抗原をチャレンジすることにより誘導される遅延型の炎症反応を観察することにより行うことができる。

【0066】後述の実施例に示されるように、抗IL-6受容体抗体の投与により、マウス遅延型足せき浮腫反応において、遅延型炎症反応の抑制が認められた。遅延型足せき浮腫反応には感作T細胞が関与していることが知られていることから、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストは感作T細胞に対して抑制効果を有することが示された。

【0067】4. 投与経路および製剤

本発明の感作T細胞関与疾患の予防または治療剤は、非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.01mgから100mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1～1000mg、好ましくは5～50mgの投与量を選ぶことができる。

【0068】本発明の感作T細胞関与疾患の予防または治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ベクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアガム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリアルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。

【0069】使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。本発明の予防または治療対象疾患は、感作T細胞が関与する疾患である。具体的には、遅延性過敏症、慢性甲状腺炎、ぶどう膜炎、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎または多発性硬化症等が挙げられる。本発明の予防または治療剤は、これら感作T細胞が関与する疾患の予防または治療剤として有用である。

【0070】

【実施例】以下、実施例、参考例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1. 遅延型足せき反応抑制作用

フロイントの不完全アジュバントにミコバクテリウム・ブチリカム(Mycobacterium butyricum)の乾燥死菌を2.5mg/mlとなるように加えて乳剤とした後、C57BL/6系雌性マウスにその0.2mlを皮下注射して抗原感作を行った。14日後に生理的食塩水に懸濁した10mgのミコバクテリウム・ブチリカム(Mycobacterium butyricum)の乾燥死菌を、右側フットパッド(foot pad)に皮下注射して反応を惹起した。24時間後に左右のフットパッド(foot pad)重量を測定し、重量の差を反応の強さとした。

【0071】MR16-1抗体は抗原感作と同時に1回のみ0.125mg、0.5mgあるいは2mgを腹腔内投与した。コントロール群にはイソタイプが同じであるラットIgG(KH-5)を、また、感作しなかったマウス群には生理的食塩水を同様に投与した。その結果は図1に示す通りである。抗原感作日に1回MR16-1を投与することにより、遅延型足せき浮腫反応は用量依存的に抑制された。

【0072】参考例1. ヒト可溶性IL-6受容体の調製

Yamasakiらの方法(Science(1988)241, 825-828)に従い得られたIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R.236を用いて、PCR法により可溶性IL-6受容体を作成した。プラスミドpBSF2R.236を制限酵素Sph Iで消化して、IL-6受容体cDNAを得、これをmp18(Amersham製)に挿入した。IL-6受容体cDNAにストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマーを用いて、インビトロミュータジェネシスシステム(Amersham製)により、PCR法でIL-6受容体cDNAに変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸345の位置に導入され、可溶性IL-6受容体をコードするcDNAが得られた。

【0073】可溶性IL-6受容体cDNAをCHO細胞で発現するために、プラスミドpSV(Pharmacia製)と連結させ、プラスミドpSVL344を得た。dhfrのcDNAを含むプラスミドpECEdhfrにHind III-Sal Iで切断した可溶性IL-6受容体cDNAを挿入し、CHO細胞発現プラスミドpECEdhfr344を得た。10μgのプラスミドpECEdhfr344をdhfr-CHO細胞株DXB-11(Urland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1980)77, 4216-4220)へカルシウムフォスフェイト沈降法(Chen et al., Mol. Cell. Biol.(1987)7, 2745-2751)により、トランスフェクトした。トランスフェクトしたCHO細胞を1mMグルタミン、10%透析FCS、100U/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを含むヌクレオシド不含αMEM選択培養液で3週間培養した。

【0074】選択されたCHO細胞を限界希釈法でスクリーニングし、単一のCHO細胞クローンを得た。このCHO細胞クローンを20nM-200nMの濃度のメトトレキセート(MTX)で増幅し、ヒト可溶性IL-6受容体産生CHO細胞株5E27を得た。CHO細胞株5E27を5%FBSを含むイスコー

ブ改変ダルベコ培養液 (IMDM, Gibco 製) で培養した。培養上清を回収し、培養上清中の可溶性IL-6受容体の濃度をELISAにて測定した。

【0075】参考例2. ヒト抗IL-6抗体の調製

10 μ g の組換え型IL-6 (Hiranoら, Immunol. Lett., 17:41, 1988) をフロイント完全アジュバントとともにBALB/cマウス免疫し、血清中に抗IL-6抗体が検出できるまで一週間毎にこれを続けた。局所のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリエチレングリコール1500を用いてミエローマ細胞株P3U1と融合させた。ハイブリドーマをHAT培養液を用いるOiらの方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) に従って選択し、ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

【0076】ヒト抗IL-6抗体を産生するハイブリドーマは下記のようにしてIL-6結合アッセイをおこなった。すなわち、柔軟なポリビニル製の96穴マイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製, Alexandria, VA) を0.1Mのcarbonate-hydrogen carbonate緩衝液 (pH 9.6) 中で100 μ l のヤギ抗マウスIg (10 μ l/ml, Cooper Biomedical, Inc製 Malvern, PA) により4℃で一晩コートした。次いで、プレートを100 μ l の1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSにより室温で2時間処理した。

【0077】これをPBSで洗浄した後、100 μ l のハイブリドーマ培養上清を各穴へ加え、4℃にて一晩インキュベートした。プレートを洗浄して、2000cpm/0.5ng/we IIとなるように¹²⁵I標識組換え型IL-6を各穴へ添加し、洗浄した後各穴の放射活性をガンマカウンター (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) で測定した。216個のハイブリドーマクローンのうち32個のハイブリドーマクローンがIL-6結合アッセイにより陽性であった。これらのクローンのなかで最終的に安定なMH166.BSF2が得られた。該ハイブリドーマが産生する抗IL-6抗体MH166はIgG1 κ 型のサブタイプを有する。

【0078】ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマクローンMH166.BSF2を用いてMH166によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を調べた。MH166.BSF2細胞を1 \times 10⁴/200 μ l/穴となるように分注し、これにMH166抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、15.1Ci/mMの³Hチミジン (New England Nuclear, Boston, MA) を加えた後、更に6時間培養を続けた。細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター (Labo Mas h Science Co., Tokyo, Japan) で処理した。コントロールとしてウサギ抗IL-6抗体を用いた。その結果、MH166抗体はIL-6により誘導されるMH166.BSF2細胞の³Hチミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166抗体はIL-6の活性を中和することが明らかとなった。

【0079】参考例3. ヒト抗IL-6受容体抗体の調製

Hirataらの方法 (J. Immunol., 143:2900-2906, 1989) により作成した抗IL-6抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B (Pharmacia Fine Chemicals製, Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6レセプター (Science (1988) 241, 825-828) を精製した。ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン (Wako Chemicals製), 10mMトリエタノールアミン (pH 7.8) および0.15M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオリドハイドロクロリド (Wako Chemicals製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6回洗浄し、免疫するための部分精製IL-6受容体とした。

【0080】BALB/cマウスを3 \times 10⁹個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6受容体で10日おきに4回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性穴からのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6受容体への結合活性を調べた。5 \times 10⁷個のU266細胞を³⁵S-メチオニン (2.5mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液 (pH3.4) により³⁵S-メチオニン標識IL-6受容体を流出させ、0.025mlの1M Tris (pH 7.4) で中和した。

【0081】0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein G セファロース (Pharmacia 製) と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mlの³⁵S標識IL-6受容体溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6受容体と反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1を樹立した。ハイブリドーマPM-1から産生される抗体は、IgG1 κ 型のサブタイプを有する。

【0082】ハイブリドーマPM-1が産生する抗体のヒトIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組換え型IL-6を大腸菌より調製し (Hiranoら, Immunol. Lett., 17:41, 1988)、ボルトン-ハンター試薬 (New England Nuclear, Boston, MA) により¹²⁵I標識した (Taga, T et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967)。4 \times 10⁵個のU266細胞を100倍量の過剰な非標識IL-6の存在下で室温にて、1時間、70% (v/v) のハイブリドーマPM-1の培養上清を14000cpmの¹²⁵I標識IL-6とともに培養した。70 μ lのサンプルを400 μ lのマイクロフュージポリエチレンチューブに300 μ lのFCS上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。その結果、ハイブリドーマPM-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

【0083】参考例4. マウス抗IL-6受容体抗体の調製

Saito, et al., J. Immunol. (1993) 147, 168-173に記載の方法により、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を調製した。マウス可溶性IL-6受容体を産生するCHO細胞を10%FCSを含むIMDM培養液で培養し、その培養上清からマウス可溶性IL-6受容体RS12（上記Saito, et al参照）とAffigel 10ゲル（Biorad）に固定したアフィニティーカラムを用いてマウス可溶性IL-6受容体を精製した。

【0084】得られたマウス可溶性IL-6受容体50 μ gをフロイント完全アジュバンドと混合し、ウイスターラット（日本チャルズリバー）の腹部に注射した。2週間後からはフロイント不完全アジュバンドで追加免疫した。45日目にラットを屠殺し、その脾細胞約 2×10^8 個を 1×10^7 個のマウスミエローマ細胞P3U1と50%のPEG1500（ペーリンガーマンハイム）をもちいて常法により細胞融合させた後、HAT培地にてハイブリドーマをスクリーニングした。

【0085】ウサギ抗ラットIgG抗体（カッセル）をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清を加えた後、マウス可溶性IL-6受容体を反応させた。次いで、ウサギ抗マウスIL-6受容体抗体およびアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgGによるELISA方によりマウス可溶性IL-6受容体に対する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。抗体の産生が確認されたハイブリドーマクローンは2回のサブスクリーニングを行い、単一のハイブリドーマクローンを得た。このクロ

ーンをMR16-1と名付けた。

【0086】このハイブリドーマが産生する抗体のマウスIL-6の情報伝達における中和活性をMH60.BSF2細胞（Matsuda et al., J. immunol. (1988) 18, 951-956）を用いた ^3H チミジンの取込みで調べた。96ウェルプレートにMH60.BSF2細胞を 1×10^4 個/200 μ l/ウェルとなるように調製した。このプレートに10pg/mlのマウスIL-6とMR16-1抗体またはRS12抗体を12.3~1000ng/mlを加えて37℃、5% CO₂で44時間培養した後、1 μ Ci/ウェルの ^3H チミジンを加えた。4時間後に ^3H チミジンの取込みを測定した。その結果MR16-1抗体はMH60.BSF2細胞の ^3H チミジン取込みを抑制した。したがって、ハイブリドーマMR16-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

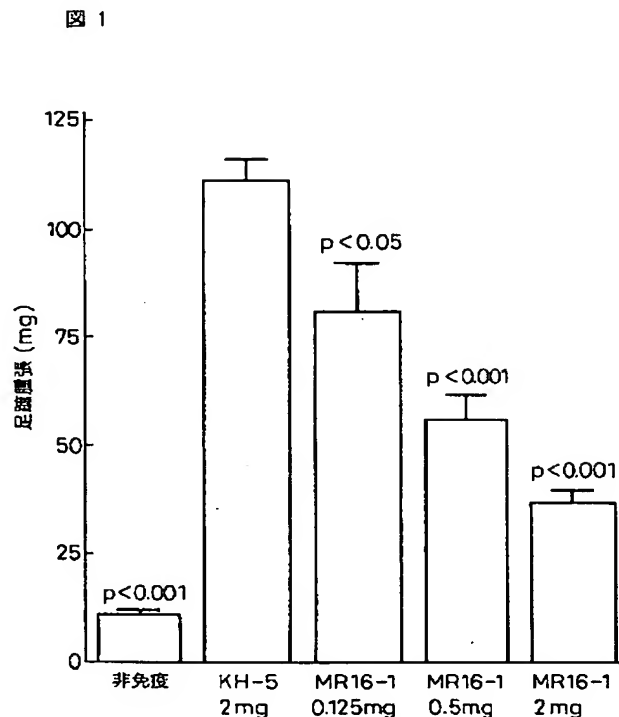
【0087】

【発明の効果】本発明により、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストが感作T細胞の抑制効果を有することが示された。したがって、IL-6アンタゴニストは多発性硬化症、ぶどう膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎またはアトピー性皮膚炎の治療剤として有用であることが明らかにされた。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、結核菌感作と同時にMR16-1を投与した際の、MR16-1のマウス遅延型足せき浮腫反応抑制作用を示す。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

// C 0 7 K 16/24

C 1 2 P 21/08

16/28

A 6 1 K 37/02

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00

C